

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-300887
(43)Date of publication of application : 15.10.2002

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C12N 1/21
C12N 9/12
C12P 13/14
//(C12N 1/21
C12R 1:15)
(C12N 1/21
C12R 1:13)
(C12N 9/12
C12R 1:15)
(C12N 9/12
C12R 1:13)
(C12P 13/14
C12R 1:15)
(C12P 13/14
C12R 1:13)

(21)Application number : 2001-162806
(22)Date of filing : 30.05.2001

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC
(72)Inventor : NAKAMURA JUN
MORIGUCHI KAYO
IZUI YUTAKA
KAWASHIMA NOBUKI
NAKAMATSU WATARU
KURAHASHI OSAMU

(30)Priority
Priority number : 2001028163 Priority date : 05.02.2001 Priority country : JP

(54) METHOD FOR PRODUCING L-GLUTAMINE BY FERMENTATION METHOD AND L-GLUTAMINE-PRODUCING BACTERIUM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve productivity and control the by-production of glutamic acid on the production of L-glutamine with a coryneform bacterium.

SOLUTION: This method for producing the L-glutamine comprises culturing in a culture medium a coryneform bacterium which has an L-glutamine-producing ability and in which the activity of a glutamine synthetase in a cell, preferably the activity of glutamic acid dehydrogenase, is reinforced, thus producing and accumulating the L-glutamine in the culture medium, and then collecting the L-glutamine.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-300887

(P2002-300887A)

(43)公開日 平成14年10月15日 (2002.10.15)

(51)Int.Cl.⁷
C 1 2 N 15/09
1/21
9/12
C 1 2 P 13/14
// (C 1 2 N 1/21

識別記号
Z NA

F I
C 1 2 N 1/21
9/12
C 1 2 P 13/14
C 1 2 R 1:15
1:13

テーマト (参考)
4 B 0 2 4
4 B 0 5 0
4 B 0 6 4
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 31 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-162806(P2001-162806)
(22)出願日 平成13年5月30日 (2001.5.30)
(31)優先権主張番号 特願2001-28163(P2001-28163)
(32)優先日 平成13年2月5日 (2001.2.5)
(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000000066
味の素株式会社
東京都中央区京橋1丁目15番1号
(72)発明者 中村 純
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素
株式会社発酵技術研究所内
(72)発明者 森口 嘉代
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素
株式会社発酵技術研究所内
(74)代理人 100089244
弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 発酵法によるL-グルタミンの製造法及びL-グルタミン生産菌

(57)【要約】

【課題】 コリネ型細菌を用いたL-グルタミンの生産において、生産性を向上させ、グルタミン酸の副生の抑制する。

【解決手段】 L-グルタミン生産能を有し、かつ細胞内のグルタミンシンテーゼ活性が増強され、好ましくはさらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が増強されたコリネ型細菌を培地に培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、これを採取することにより、L-グルタミンを製造する。

ブリダイズし、かつグルタミンシンテターゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA。

【請求項10】 下記(C)または(D)に示すたんぱく質をコードするDNA。

(C) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するたんぱく質

(D) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつグルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質。

10 【請求項11】 下記(c)又は(d)に示すDNAである請求項10記載のDNA。

(c) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2006～5200からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2006～5200からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下ハイブリダイズし、かつグルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA。

20 【発明の詳細な説明】
【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、コリネ型細菌のL-グルタミン生産菌およびL-グルタミンの製造法に関する。L-グルタミンは、調味料、肝機能促進薬、アミノ酸輸液、および総合アミノ酸製剤などの成分として、産業上有用なアミノ酸である。

30 【0002】
【従来の技術】 発酵法によってL-アミノ酸を製造するには、微生物の育種改良法が多用されてきた。すなわち、野生株そのもののL-アミノ酸生産の生産能は極めて低い場合が多いので、突然変異により栄養要求性、アナログ耐性、もしくは代謝調節変異を付与したり、又はこれらを組み合わせる方法が知られている。上述の方法によれば、それなりの収量でL-グルタミンは得られるが、工業的に安価にL-グルタミンを製造する為には、さらに発酵率を向上させることが不可欠である。

40 【0003】 また、L-グルタミン発酵においては、L-グルタミン酸が副生するという問題がある。この問題を解決する方法が、例えば特開平3-232497号公報に提案されている。この方法によれば、ある程度L-グルタミン酸の生成を抑えることができるが、依然としてL-グルタミン酸の副生があると同時に、L-グルタミンの収量が不十分である。

50 【0004】 上記のようなL-グルタミン生産菌の改良においては、変異処理剤などで宿主菌を処理し、ランダムに変異が入った菌からL-グルタミンの生産性が向上した株を選択する方策が用いられていたため、大きな労力と困難を伴っていた。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-グルタミン生産能を有し、かつ細胞内のグルタミンシンテターゼ活性が増強されたコリネ型細菌。

【請求項2】 グルタミンシンテターゼ活性の増強が、グルタミンシンテターゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンテターゼをコードする遺伝子の発現が増強されるように同遺伝子の発現調節配列を改变することによるものである請求項1記載の細菌。

【請求項3】 グルタミンシンテターゼ活性の増強が、細胞内のグルタミンシンテターゼのアデニリル化による活性調節が解除されたことによるものである請求項1記載の細菌。

【請求項4】 細胞内のグルタミンシンテターゼのアデニリル化による活性調節の解除が、アデニリル化による活性調節が解除されたグルタミンシンテターゼを前記細菌に保持させること、前記細菌細胞内のグルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性が低下したこと、又は前記細菌細胞内のPIIたんぱく質活性が低下したことのいずれか一つ又は2以上によるものである請求項3記載の細菌。

【請求項5】 さらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が増強された請求項1～4のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項6】 グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性の増強が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンテターゼをコードする遺伝子の発現が増強されるように同遺伝子の発現調節配列を改変することによるものである請求項5記載の細菌。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか一項に記載の細菌を培地に培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-グルタミンの製造法。

【請求項8】 下記(A)または(B)に示すたんぱく質をコードするDNA。

(A) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するたんぱく質。

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつグルタミンシンテターゼ活性を有するたんぱく質。

【請求項9】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項8記載のDNA。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号59～1996からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号659～1996からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下ハイ

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、コリネ型細菌のL-グルタミンの生産性向上、及びグルタミン酸の副生の抑制に至る特性を見出し、当該特性を有する菌株を用いたL-グルタミンの製造法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題点を解決すべく鋭意検討を行った結果、細胞中のグルタミンシンテーゼ活性が増強されたコリネ型細菌の菌株が、該活性が野生株並である菌株に比べて、L-グルタミン生産能において優れていると同時に、L-グルタミン酸の副生が大幅に抑制できることを見出した。また、グルタミンシンテーゼ活性とグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を同時に増強させることにより、L-グルタミンの生産速度が向上することを見出した。さらに、新規なグルタミンシンテーゼをコードする遺伝子、及びグルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下の通りである。

【0007】(1) L-グルタミン生産能を有し、かつ細胞内のグルタミンシンテーゼ活性が増強されたコリネ型細菌。

(2) グルタミンシンテーゼ活性の増強が、グルタミンシンテーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンテーゼをコードする遺伝子の発現が増強されるように同遺伝子の発現調節配列を改変することによるものである(1)記載の細菌。

(3) グルタミンシンテーゼ活性の増強が、細胞内のグルタミンシンテーゼのアデニリル化による活性調節が解除されたことによるものである(1)記載の細菌。

(4) 細胞内のグルタミンシンテーゼのアデニリル化による活性調節の解除が、アデニリル化による活性調節が解除されたグルタミンシンテーゼを前記細菌に保持させること、前記細菌細胞内のグルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性が低下したこと、又は前記細菌細胞内のPIIたんぱく質活性が低下したことのいずれか一つ又は2以上によるものである(3)記載の細菌。

(5) さらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が増強された(1)～(4)のいずれかに記載の細菌。

(6) グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性の増強が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンテーゼをコードする遺伝子の発現が増強されるよう同遺伝子の発現調節配列を改変することによるものである(5)記載の細菌。

【0008】(7) (1)～(6) いずれか一項に記載

の細菌を培地に接種し、該培地中に生成蓄積したL-グルタミンを採取することを特徴とするL-グルタミンの製造法。

【0009】(8) 下記(A)または(B)に示すたんぱく質をコードするDNA。

(A) 配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するたんぱく質。

(B) 配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつグルタミンシンテーゼ活性を有するたんぱく質。

(9) 下記(a)又は(b)に示すDNAである(8)記載のDNA。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号659～1996からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号659～1996からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミンシンテーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA。

(10) 下記(C)または(D)に示すたんぱく質をコードするDNA。

(C) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するたんぱく質。

(D) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつグルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質。

(11) 下記(c)又は(d)に示すDNAである(10)記載のDNA。

(c) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2006～5200からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2006～5200からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA。

40 【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】(1) 本発明のコリネ型細菌

本発明において、「コリネ型細菌」とは、従来ブレビパクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に分類された細菌も含み(Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビパクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0012】コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

5
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム
コリネバクテリウム・アルカノリティカム
コリネバクテリウム・カルナエ
コリネバクテリウム・グルタミカム
コリネバクテリウム・リリウム
コリネバクテリウム・メラセコーラ
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス
コリネバクテリウム・ハーキュリス
ブレビバクテリウム・ディバリカタム
ブレビバクテリウム・フラバム
ブレビバクテリウム・インマリオフィラム
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム
ブレビバクテリウム・ロゼウム
ブレビバクテリウム・サッカロリティカム
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス
コリネバクテリウム・アンモニアゲネス
ブレビバクテリウム・アルバム
ブレビバクテリウム・セリヌム
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラス
【0013】具体的には、下記のような菌株を例示することができる。
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806
コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511
コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991
コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020, ATCC13032, ATCC13060
コリネバクテリウム・リリウム ATCC15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340(FERM BP-1539)
コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868
ブレビバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020
ブレビバクテリウム・フラバム ATCC13826, ATCC14067, AJ12418(FERM BP-2205)
ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869
ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825
ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240
コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6871, ATCC6872
ブレビバクテリウム・アルバム ATCC15111
ブレビバクテリウム・セリヌム ATCC15112
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラス ATCC15354
【0014】これらを入手するには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより分譲を受けることができる。すなわち、各菌株毎に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることができる。各菌株に対応する登録番号はアメリカ

10 10 ペスト条約に基づいて寄託されている。

【0015】本発明において、「L-グルタミン生産能」とは、本発明のコリネ型細菌を培養したときに、培地中にL-グルタミンを蓄積する能力をいう。このL-グルタミン生産能は、コリネ型細菌の野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与または増強された性質であってもよい。

【0016】育種によってL-グルタミン生産能を付与または増強するには、6-ジアゾ-5-オキソ-ノルロイシン耐性を付与する方法(特開平3-232497)、プリンアナログ耐性および/またはメチオニンスルホキサイド耐性を付与する方法(特開昭61-202694)、 α -ケトマロン酸耐性を付与する方法(特開昭56-151495)、グルタミン酸を含有するペプチドに耐性を付与する方法(特開平2-186994)などが挙げられる。L-グルタミン生産能を有するコリネ型細菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

【0017】ブレビバクテリウム・フラバムAJ11573(FERM P-5492)特開昭56-151495公報参照
ブレビバクテリウム・フラバムAJ12210(FERM P-8123)
30 特開昭61-202694公報参照
ブレビバクテリウム・フラバムAJ12212(FERM P-8123)
特開昭61-202694公報参照
ブレビバクテリウム・フラバムAJ12418(FERM-BP2205)
特開平2-186994公報参照
ブレビバクテリウム・フラバムDH18(FERM P-11116)特開平3-232497公報参照
コリネバクテリウム・メラセコラDH344(FERM P-11117)
特開平3-232497公報参照
コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11574(FERM P-5493)特開昭56-151495公報参照

【0018】「細胞内のグルタミンシンテターゼ(以下、「GS」ともいう)活性が増強された」とは、細胞当たりのGS活性が野生型のコリネ型細菌のそれよりも高くなつたことをいう。例えば、細胞当たりのGS分子の数が増加した場合や、GS分子当たりのGS活性が上昇した場合などが該当する。また、比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えばブレビバクテリウム・フラバム ATCC14067である。細胞内のGS活性が増強された結果、培地中のL-グルタミン蓄積量が上昇するという効果や、L-グルタミン酸の副生が減少するという効果がある。

【0019】コリネ型細菌細胞内のGS活性の増強は、GSをコードする遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、GSをコードする遺伝子断片を、該細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これをレーグルタミン生産能を有する宿主に導入して形質転換すればよい。また、野生型のコリネ型細菌に上記組換えDNAを導入して形質転換株を得、その後当該形質転換株にレーグルタミン生産能を付与してもよい。

【0020】GS遺伝子は、コリネ型細菌由来の遺伝子およびエシェリヒア属細菌等の他の生物由来の遺伝子のいずれも使用することができる。このうち、発現の容易さの観点からは、コリネ型細菌由来の遺伝子が好ましい。

【0021】コリネ型細菌のGSをコードする遺伝子として、既にglnAが明らかにされている(FEMS Microbiology Letters 81-88, (154) 1997)ので、その塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば配列表配列番号4および5に示すプライマーを用いて、コリネ型細菌の染色体DNAを錆型とするPCR法(PCR: polymerase chain reaction; White, T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989) 参照)によって、GS遺伝子を取得することができる。他の微生物のGSをコードする遺伝子も、同様にして取得され得る。

【0022】染色体DNAは、DNA供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法(H. Saito and K. Miura, Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)、生物工学実験書、日本生物工学会編、97~98頁、培風館、1992年参照)等により調製することができる。

【0023】一方、アミノ酸生合成系に関与する酵素にはアイソザイムが存在することが多い。本発明者らは、前述のglnA遺伝子の塩基配列との相同性を利用して、コリネ型細菌のGSのアイソザイムをコードする遺伝子の単離およびクローン化に成功した。この遺伝子を「glnA2」とする。その取得工程は後述する。glnA2も、glnAと同様に、コリネ型細菌のGS活性の増強に利用することができる。

【0024】PCR法により増幅されたGS遺伝子は、エシェリヒア・コリ及び/またはコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをエシェリヒア・コリに導入しておくと、後の操作がしやすくなる。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pBR322, pACYC184, pMW219等が挙げられる。

【0025】コリネ型細菌で機能するベクターとは、例えばコリネ型細菌で自律複製できるプラスミドである。具体的に例示すれば、以下のものが挙げられる。

pAM330 特開昭58-67699号公報参照

pHM1519 特開昭58-77895号公報参照

pSFK6 特開2000-262288号公報参照

また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

【0026】このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の受託番号をかっこ内に示した。

pAJ655 エシェリヒア・コリAJ11882(FERM BP-136)コリネ型細菌SR8201(ATCC39135)

pAJ1844 エシェリヒア・コリAJ11883(FERM BP-137)コリネ型細菌SR8202(ATCC39136)

pAJ611 エシェリヒア・コリAJ11884(FERM BP-138)

pAJ3148 コリネ型細菌SR8203(ATCC39137)

pAJ440 パチス・ズブチリスAJ11901(FERM BP-140)

pHC4 エシェリヒア・コリAJ12617(FERM BP-3532)

【0027】これらのベクターは、寄託微生物から次のようにして得られる。対数増殖期に集められた細胞をリゾーム及びSDSを用いて溶菌し、30000×gで遠心分離して溶解物から得た上澄液にポリエチレングリコールを添加し、セシウムクロライド-エチジウムプロマイド平衡密度勾配遠心分離により分別精製する。

【0028】GS遺伝子とコリネ型細菌で機能するベクターを連結して組換えDNAを調製するには、GS遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結はT4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

【0029】上記のように調製した組換えDNAをコリネ型細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリK-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))があり、パチス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法(Duncan, C.H., Wilson, G. A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977))がある。あるいは、パチス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法(Chang, S. and Cho, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, D.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))も応用できる。また、コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法(杉本ら、特開平2-207791号公報)によっても行うことができる。

【0030】GS遺伝子のコピー数を高めることは、GS遺伝子をコリネ型細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによっても達成できる。コリネ型細菌の染色体DNA上にGS遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーテッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、GS遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。

【0031】GS活性の増強は、上記の遺伝子增幅による以外に、染色体DNA上またはプラスミド上のGS遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。また、国際公開W000/18935に開示されているように、GS遺伝子のプロモーター領域に数塩基の塩基置換を導入し、より強力なものに改変することも可能である。これらのプロモーター置換または改変によりGS遺伝子の発現が強化され、GS活性が増強される。これら発現調節配列の改変は、GS遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0032】発現調節配列の置換は、例えば後述の温度感受性プラスミドを用いた遺伝子置換と同様にして行うことができる。コリネ型細菌の温度感受性プラスミドとしては、p48K及びpSFKT2（以上、特開2000-262288号公報参照）、pHS4（フランス特許公開1992年2667875号公報、特開平5-7491号公報参照）等が挙げられる。これらのプラスミドは、コリネ型細菌中で少なくとも25℃では自律複製することができるが、37℃では自律複製できない。後記実施例では、GDP遺伝子のプロモーター配列を置換する際にpSFKT2を用いたが、pSFKT2の代わりにpHS4を用いて、同様にして遺伝子置換を行うことができる。pHS4を保持するエシェリヒア・コリAJ12571は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター）（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に受託番号FERM P-11763として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3524の受託番号で寄託されている。

【0033】GS活性の増強は、上記のようなGS遺伝子の発現量を増強する以外に、細胞内のGSのアデニリル化による活性調節が解除されることによっても達成される。GSは、そのアミノ酸配列中のチロシン残基をアデニリ化されることにより不活性型に変化する（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 642-649, (58) 1967）（J. Biol. Chem., 3769-3771, (243) 1968）。したがって、このGSのアデニリル化を解除することによって、細胞内のGS活性を

増強することができる。ここで、アデニリル化の解除とは、アデニリル化が実質的に完全に解除されることに加えて、細胞内のGS活性が増強されるようにアデニリル化が低減されることを含む。

【0034】GSのアデニリル化は、一般にアデニルトランスフェラーゼによって行われる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1703-1710, (58) 1967）。コリネ型細菌においては、Genebank accession Y13221の配列に示されるglnA遺伝子産物の405位のチロシン残基がアデニリル化されることが示唆されている（FEMS Microbiology Letters, 303-310, (173) 1999）。このチロシン残基を他のアミノ酸残基に置換するようにglnA遺伝子に変異を導入することによってGSのアデニリル化による不活性化を解除できる。

【0035】また、細胞内のグルタミンシンテターゼ・アデニルトランスフェラーゼ（ATase）の活性を低下させることによっても、GSのアデニリル化による不活性化を解除できる。コリネ型細菌のアデニルトランスフェラーゼは未知であったが、本発明者らは、コリネ型細菌のアデニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子glnEの単離に成功した。その工程については後述する。

【0036】コリネ型細菌の細胞内のATase活性を低下させるには、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射またはN-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、ATase活性が低下した変異株を選択する方法が挙げられる。また、ATase活性が低下したコリネ型細菌は、変異処理の他に、ATaseをコードする遺伝子（glnE）の部分配列を欠失し、正常に機能するATaseを産生しないように改変したglnE遺伝子（欠失型glnE）を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型glnEと染色体上のglnEとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のglnEを破壊することができる。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある。

【0037】欠失型glnEを、宿主染色体上のglnEと置換するには、例えば以下のようにすればよい。温度感受性複製起点と変異型glnEとクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

【0038】こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するglnE配列との組換えを起こし、染色体glnEと欠失型glnEとの融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感

感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー)を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常なglnEが優性であるので、形質転換株は正常なATaseを発現する。

【0039】次に、染色体DNA上に欠失型glnEのみを残すために、2個のglnEの組換えにより1コピーのglnEを、ベクター部分(温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカーを含む)とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なglnEが染色体DNA上に残され、欠失型glnEが切り出される場合と、反対に欠失型glnEが染色体DNA上に残され、正常なglnEが切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状で細胞内に保持される。次に、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、プラスミド上のglnEは、プラスミドとともに細胞から脱落する。そして、PCRまたはサザンハイブリダイゼーション等により、染色体上に欠失型glnEが残った株を選択することによって、glnEが破壊された株を取得することができる。

【0040】また、細胞内のPIIたんぱく質の活性を低下させることによっても、GSのアデニリル化による不活性化を解除できる。ATaseによるGSのアデニリル化にはPIIたんぱく質も関与することが知られている。PIIたんぱく質とは、GS活性を調節するためのシグナル伝達たんぱく質であり、ウリジリルトランスフェラーゼ(UTase)によるウリジリル化を受けることが知られている。ウリジリル化されたPIIたんぱく質は、ATaseによるGSの脱アデニリル化を促進し、脱ウリジリル化されたPIIたんぱく質はATaseによるGSのアデニリル化を促進する。

【0041】UTaseの欠損株においてはGSが高度にアデニリル化されることが報告されている(*J. Bacteriology*, 569-577, (134) 1978)。過剰にアデニリル化されるこの表現形は、PIIたんぱく質の変異によって抑制される(*J. Bacteriology*, 816-822, (164) 1985)。すなわちPIIたんぱく質の活性低下によっても、GSのアデニリル化による不活性化を解除できる。PIIたんぱく質の活性低下とは、ATaseによるアデニリル化を促進する機能が低下することをいう。コリネ型細菌のPIIたんぱく質をコードするglnB遺伝子は既に単離されており、その欠失によりGSのアデニリル化による抑制が解除されることが示唆されている(*FEBS Microbiology Letters*, 303-310, (173) 1999)。

【0042】コリネ型細菌のPIIたんぱく質の活性を低下させるためには、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは重硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、PIIたんぱく質の活性が低下した菌株を選択する方法が挙げられる。また、PIIたんぱく質の活性が低下したコリネ型細菌は、変異処理の他に、PIIたんぱく質をコードする遺伝子glnBの部分配列

を消失し、正常に機能するPIIたんぱく質を产生しないように改変したglnB遺伝子(欠失型glnB遺伝子)を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型glnBと染色体上のglnBとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のglnBを破壊することができる。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立されており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある。

【0043】欠失型glnBを宿主染色体上のglnBと置換するためには、例えば以下のようにすればよい。温度感受性複製起点と変異型glnEとクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換体が得られる。

【0044】こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にともと存在するglnB配列との組換えを起こし、染色体glnBと欠失型glnBとの融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分(ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー)を挟んだ状態で染色体上に挿入されている。したがって、この状態では正常なglnBが優性であるので、形質転換体は正常なglnBを発現する。

【0045】次に、染色体DNA上に欠失型glnBのみを残すために、2個のglnBの組換えにより1コピーのglnBを、ベクター部分(温度感受性複製起点および薬剤耐性マーカーを含む)とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なglnBが染色体上に残され、欠失型glnBが切り出される場合と、反対に欠失型glnBが染色体DNA上に残され、正常なglnBが切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状で細胞内に安定に保持される。次に、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、プラスミド上のglnBは、プラスミドとともに細胞から脱落する。そして、PCRまたはサザンハイブリダイゼーション等により、染色体上に欠失型glnEが残った株を選択することによって、glnBが破壊された株を取得することができる。

【0046】GSのアデニリル化の解除は、上記のアデニリル化を受けないようなGSの変異、ATaseの活性低下、及びPIIたんぱく質の活性低下から選ばれる2つ、又は3つの手段を組み合わせることによって、達成することができる。

【0047】GS活性の増強は、上述のようなATaseによるGSのアデニリル化の解除によっても可能であるが、前述のGS遺伝子のコピー数を高める手段や、発現調節配列の改変をする手段と組み合わせて行ってもよい。

【0048】本発明のコリネ型細菌を用いてレーグルタ

ミンを効率よく生産するには、GS活性と同時にグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（以下、「GDH」ともいう）活性が高められた菌株を用いるのが好ましい。

【0049】「細胞内のGDH活性が増強された」とは、細胞当たりのGDH活性が野生型のコリネ型細菌のそれよりも高くなったことをいう。例えば、細胞当たりのGDH分子の数が増加した場合や、GDH分子当たりのGDH活性が上昇した場合などが該当する。また、比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えばブレビバクテリウム・フラバム ATCC14067である。細胞内のGDH活性が増強された結果、L-グルタミン生産能を有するコリネ型細菌の培養時間が短縮されるという効果がある。

【0050】コリネ型細菌細胞内のGDH活性の増強は、GDHをコードする遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、GDHをコードする遺伝子断片を、該細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これをL-グルタミン生産能を有する宿主に導入して形質転換すればよい。また、野生型のコリネ型細菌に上記組換えDNAを導入して形質転換株を得、その後当該形質転換株にL-グルタミン生産能を付与してもよい。

【0051】GDHをコードする遺伝子は、コリネ型細菌の遺伝子を用いることも、エシェリヒア属細菌等の他の生物由来の遺伝子のいずれも使用することができる。発現容易の観点からは、コリネ型細菌由来の遺伝子を用いることが好ましい。

【0052】コリネ型細菌のGDHをコードする遺伝子（gdh遺伝子）の塩基配列は、既に明らかにされている（Molecular Microbiology (1992) 6 (3), 317-326）ので、その塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば配列表記番号12及び13に示すプライマーを用いて、コリネ型細菌染色体DNAを鋳型とするPCR法によって、gdh遺伝子を取得することができる。コリネ型細菌等の他の微生物のGDHをコードする遺伝子も、同様にして取得され得る。gdhのコリネ型細菌への導入は、前記のGS遺伝子と同様にして行うことができる。

【0053】また、本発明のコリネ型細菌は、GSおよびGDH以外のL-グルタミン生合成を触媒する酵素の活性が増強されていてもよい。例えばグルタミン生合成を触媒する酵素としては、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニット酸ヒドラターゼ、クエン酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ等がある。

【0054】さらに、L-グルタミンの生合成経路から分岐してL-グルタミン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。このような反応を触媒する酵素としては、イソクエン酸リーゼ、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸シンターゼ等が挙げられる。

【0055】(2) 本発明の微生物を用いたL-グルタミンの生産

上記のようにして得られるコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、該培地からL-グルタミンを採取することにより、L-グルタミンを効率よく製造することができ、かつ、L-グルタミン酸の副生を抑制することができる。

【0056】本発明のコリネ型細菌を用いてL-グルタミンを生産するには、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いて常法により行うことができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は培養する菌株の利用可能であるものならばいずれの種類を用いててもよい。

【0057】炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

【0058】窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、りん酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

【0059】有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆たん白分解物等が使用され、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。

【0060】無機塩類としてはりん酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。培養は、発酵温度20~45°C、pHを5~9に制御し、通気培養を行う。培養中にpHが下がる場合には、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。かくして10時間~120時間程度培養することにより、培養液中に著量のL-グルタミンが蓄積される。

【0061】培養終了後の培養液からL-グルタミンを採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に、濃縮晶析することによって採取される。

【0062】(3) 本発明のグルタミンシンテターゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA (glnA2遺伝子) および、グルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA (glnE遺伝子)

【0063】本発明の第一のDNAは、GSをコードする遺伝子である。また、本発明の第二のDNAは、ATaseをコードする遺伝子である。これらの遺伝子は、公知の

glnA遺伝子の部分断片をプローブとするハイブリダイゼーションによって、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの染色体DNAライリブラーから取得することができる。公知のglnA遺伝子の部分断片は、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム、例えばプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株の染色体DNAを鑄型にして、配列番号18および19に示すプライマーを用いてPCR法によって増幅することによって取得される。

【0064】本発明のDNAの取得、及び、前記のGS活性及びGDI活性の増強に際して、ゲノムDNAライブラーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21 (1989)に記載されている。

【0065】上記プライマーの塩基配列は、それぞれコリネバクテリウム・グルタミカムのglnA遺伝子 (GenBank ACCESSION Y13221) の塩基配列に基づいて設計されたものであり、これらのプライマーを用いれば、glnA遺伝子 (GenBank ACCESSION Y13221) の塩基番号1921～2282に相当する領域を含むDNA断片が得られる。

【0066】上記のようにして得られる本発明のglnA2を含むDNA断片の塩基配列及びこの配列がコードし得るアミノ酸配列の一例を配列番号1に示す。また、glnA2がコードするグルタミンシンテーゼ活性を有するたんぱく質のアミノ酸配列のみを配列番号2に示す。

【0067】また、前記のDNA断片中には、glnA2遺伝子のORFのすぐ下流に別のORFが見出された。既知の配列との相同性比較の結果、当該ORFはグルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質(ATase)をコードする遺伝子(glnE)であると予想された。ATase活性を有するたんぱく質のアミノ酸配列のみを配列番号3に示す。

【0068】本発明のglnA2又はglnEを含むDNA断片は、本発明によりその塩基配列が明らかになったので、同塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCR法により、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの染色体DNAから単離することができる。

【0069】本発明の第一のDNAは、コードされるたんぱく質のグルタミンシンテーゼ活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むグルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のたんぱく質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には2から90個、好ましくは、2から50個、より好ましくは2から20個である。

【0070】本発明の第二のDNAは、コードされるたんぱく質のグルタミンシンテーゼ・アデニリルトラン

スフェラーゼ活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むグルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のたんぱく質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には2から350個、好ましくは、2から50個、より好ましくは2から20個である。グルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼの活性を損なう場合においても、相同組換えを起こす限り本発明に含まれる。

【0071】上記のようなGS又はATaseと実質的に同一のたんぱく質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように、glnA2又はglnEの塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、変異処理前のDNAをヒドロキシルアミン等でインヒトロ処理する方法、及び変異処理前のDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亞硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0072】上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物の活性を調べることにより、グルタミンシンテーゼ、または、グルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼと実質的に同一のたんぱく質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するグルタミンシンテーゼ、もしくは、グルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち塩基番号659～1996または2066～5200からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グルタミンシンテーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA、または、グルタミンシンテーゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNAを単離することによっても、GS又はATaseと実質的に同一のたんぱく質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1% SDS

に相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0073】プローブとして、配列番号1の塩基配列の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、配列番号1の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、配列番号1の塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50°C、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

【0074】上記のような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎグルタミンシンテターゼ活性、または、グルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を、例えばグルタミンシンテターゼ活性についてはMethods in Enzymology, Vol. XVIIA, 910-915, ACADEMIC PRESS (1970)記載の方法で、グルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性についてはMethods in Enzymology Vol. XVIIA, 922-923, ACADEMIC PRESS (1970)記載の方法で、それぞれ測定することによって、容易に選別することができる。活性が低下あるいは欠失したグルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードするDNAも本発明においては利用可能である。

【0075】GSと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAとして具体的には、配列番号2に示すアミノ酸配列と、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有し、かつGS活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。また、ATaseと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAとして具体的には、配列番号3に示すアミノ酸配列と、好ましくは65%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有し、かつATase活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。

【0076】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0077】

【実施例1】GS遺伝子增幅株の評価

(1) コリネ型細菌のglnA遺伝子のクローニング

コリネバクテリウム・グルタミカムのglnA配列は既に明らかにされている(FEMS Microbiology Letters 81-88, (154) 1997)。報告されている塩基配列に基づいて、配列表配列番号4および5に示すプライマーを合成し、プレビバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型にしてPCR法によりglnA断片を增幅した。

【0078】プレビバクテリウム・フラバムATCC14067

株の染色体DNAの調製は、Bacterial Genome DNA Purific

ation Kit(Advanced Genetic Technologies Corp.)を用いて行った。また、PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase(宝酒造)を用い、変性94°C 30秒、会合55°C 15秒、伸長72°C 2分の条件で30サイクル行った。

【0079】生成したPCR産物を常法により精製後、制限酵素SalIで切断し、SalIで切断したpMW219(ニッポンジーン)とライゲーションキット(宝酒造)を用いて連結した後、エシエリヒア・コリJM109のコンピテントセル(宝酒造)を形質転換し、IPTG 10μg/ml, X-Gal 40μg/mlおよびカナマイシン25μg/mlを含むL培地に塗布し、一晩培養した。その後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー一分離し、形質転換体を得た。

【0080】形質転換体からアルカリ法によりプラスミドを調製した後、ベクターにglnA遺伝子が挿入されているプラスミドをpMW219GSと名付けた。

【0081】(2) glnAとコリネ型細菌の複製起点を有するプラスミドの構築さらに、glnA遺伝子とコリネ型細菌の複製起点を有するプラスミドを構築するために、既に取得されているコリ

20 ネ型細菌で自律複製可能なプラスミドpHM1519(Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984))由来の複製起点を持つプラスミドpHK4(特開平5-7491号公報参照)を制限酵素BamHIおよびKpnIで消化して、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片をDNA平滑末端化キット(宝酒造)を用いて平滑末端化した後、KpnIリンカー(宝酒造)を用いてpMW219GSのKpnI部位に挿入した。本プラスミドをpGSと名付けた。

【0082】(3) コリネ型細菌へのpGSの導入と培養評価

30 L-グルタミン生産菌プレビバクテリウム・フラバムAJ12418(FERM BP-2205:特開平2-186994号公報参照)を電気パルス法(特開平2-207791号公報参照)によりプラスミドpGSで形質転換し、形質転換体を得た。得られた形質転換体AJ12418/pGSを用いてL-グルタミン生産のための培養を以下のように行った。

【0083】25μg/mlのカナマイシンを含むCM2Bプレート培地にて培養して得たAJ12418/pGS株の菌体を、グルコース100g、(NH₄)₂SO₄ 60g、KH₂PO₄ 2.5g、MgSO₄·7H₂O 0.4g、FeSO₄·7H₂O 0.01g、VB₁-HCl 350μg、ビオチン4μg、大豆加水分解物200mg、CaCO₃ 50gを純水1Lに含む培地(NaOHでpH6.8に調整されている)に接種し、31.5°Cにて培地中の糖が消費されるまでしんとう培養した。

【0084】培養終了後、培養液中のL-グルタミン蓄積量は、培養液を適当に希釀した後、液体クロマトグラフィーにより分析した。カラムはCAPCELL PAK C18(資生堂)を用い、サンプルは0.095%リン酸、3.3mMヘプタンスルホン酸、5%アセトニトリルを蒸留水1Lに含む溶離液で溶出し、210nmの吸光度の変化によりL-グルタミン蓄積量を分析した。このときの結果を表1に示した。

【0085】

* * 【表1】

表1

菌株	L-Gln(g/L)	L-Glu(g/L)	培養時間(hr)
AJ12418	38.4	0.7	70
AJ12418/pGS	45.1	0.02	82

【0086】pGS導入株ではL-グルタミン(L-Gln)の蓄積が顕著に向上了し、またL-グルタミン酸(L-Glu)の副生が大幅に抑制された。これらの結果から、L-グルタミンの生産において、GSの増強が収量の向上に有効であることが示された。なお、GSの酵素活性のデータは、実施例2の表2に示した。

【0087】

【実施例2】GSアデニリル化部位改変株の評価

(1) アデニリル化部位改変プラスミドの構築

コリネ型細菌のglnA遺伝子産物のアデニリル化部位は、既に明らかにされている(FEMS Microbiology Letters, 303-310, (173)1999)。そこで、アデニリル化部位が改変されたglnA遺伝子で、染色体上のglnA遺伝子とを置換することにより、アデニリル化部位改変株の取得を行った。具体的な方法を以下に記す。

【0088】まずプレビバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型として、配列表配列番号6と7の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、glnA遺伝子N末端側の増幅産物を得た。一方、glnA遺伝子C末端側の増幅産物を得るために、プレビバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型として、配列表配列番号8と9の合成DNAをプライマーとしてPCRを行った。配列表配列番号7と8にはミスマッチが導入されているので、これらの増幅産物の末端には変異が導入される。次に、変異が導入されたglnA遺伝子断片を得るために、上記glnA N末端およびC末端の遺伝子産物を、それぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列表※

表2

菌株	L-Gln(g/L)	GS活性(U/mg)	培養時間(hr)
AJ12418	39.0	0.030	70
AJ12418/pGS	46.1	0.067	81
QA-1	44.3	0.040	72

【0092】QA-1株ではAJ12418に比べ、L-グルタミン蓄積の向上が認められた。これらの株のGS活性について測定した結果についても、表2に示した。GS活性は、Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.70, No.3, 182-184, 1990に記載の方法を参考とし、イミダゾール-HCl(pH7.0)100mM, NH₄Cl 0.1mM, MnCl₂ 1mM, ホスホエノールビルビン酸1mM, NADH 0.3mM, ラクター

※配列番号10と11の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、アデニリル化部位に変異導入されたglnA遺伝子増幅産物を得た。生成したPCR産物を常法により精製後、HincIIで消化し、pHS299(宝酒造)のHincII部位に挿入した。このプラスミドをpGSAと名付けた。

【0089】(2) アデニリル化部位改変株の構築と培養評価

上述のpGSAは、コリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。

【0090】L-グルタミン生産菌プレビバクテリウム・フラバムAJ12418を電気パルス法(特開平2-207791号公報参照)により高濃度のプラスミドpGSAを用いて形質転換し、カナマイシン耐性を指標として形質転換体を得た。次にこれらの形質転換体を継代培養し、カナマイシン感受性となった株を取得した。さらに、カナマイシン感受性株のglnA遺伝子の配列を決定し、その配列中のアデニリル化部位がpGSA由来のglnAのその領域と置換されたものをQA-1と名付けた。AJ12418、AJ12418/pGS、QA-1株を用いて、L-グルタミン生産のための培養を実施例1(3)記載の方法と同様にして行った。その結果を表2に示した。

【0091】

【表2】

トデヒドロゲナーゼ10U, ビルビン酸キナーゼ25U, ATP 1mM, MSG 10mMを含む溶液に、粗酵素液を加え、30°Cにおける340nmの吸光度変化を測定することによって測定した。ブランクの測定には、上記反応液よりMSGを除いたものを用いた。粗酵素液は、上記の培養液より遠心分離により菌体を分離し、イミダゾール-HCl(pH7.0)100mM 50で洗浄後、超音波破碎し、未破碎菌体を遠心分離で除去

することにより、調製した。粗酵素液のたんぱく質濃度は、牛血清アルブミンを標準試料として、Protein Assay (Bio-Rad) を用いて定量した。

【0093】

【実施例3】GDH遺伝子増幅株の評価

(1) gdh増幅株の構築と培養評価

コリネ型細菌のgdh遺伝子がクローニングされたプラスミドpGDHの構築は、以下のように行った。まずプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株の染色体DNAを抽出し、これを鋳型として、配列表配列番号12と13の合成DNAをプライマーとしてPCR反応を行った。得られたDNA断片を平滑末端化し、これをpHS399 (宝酒造) のSmaI部位に挿入した。このプラスミドをpHS399GDHと名付けた。

【0094】次に、pHS399GDHのSall部位に、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドpHM1519(Agric. Biol.)*

表3

菌株	L-Gln(g/L)	L-Glu(g/L)	培養時間(hr)
AJ12418	38.8	0.7	70
AJ12418/pGDH	29.5	12.0	55

【0097】

【実施例4】GSおよびGDHを同時に増強した株の構築と評価

(1) gdhプロモーター改変プラスミドの構築

プレビバクテリウム・ラバムATCC14067株の染色体DNAを抽出し、これを鋳型として、配列表配列番号14と15の合成DNAをプライマーとしてPCR反応を行った。得られたDNA断片を制限酵素StuI、PvuIIで切断し、これをpHS399のSmaI部位に挿入した。このプラスミドを制限酵素SacIで処理することによりgdhプロモーターおよびgdh遺伝子の部分断片を含むDNA断片を取得し、pKF19k (宝酒造) のSacI部位に挿入した。このプラスミドをpKF19GDHと名付けた。

【0098】プロモーター領域への変異の導入には、Mutan-Super Express Km (宝酒造) を用いた。pKF19GDHを鋳型として、Mutan-super Express Km添付のセレクションプライマーと変異導入用のプライマーとして配列表配列番号16又は17の5'末端リーン酸化合成DNAを添加して、LA-PCRを行った。反応産物はエタノール沈殿により精製した後、これを用いてエシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル (宝酒造) を形質転換し、形質転換体※

表4

プラスミド	gdhプロモーター配列
pKF19GDH	TGGTCATatctgtgcgacgtgcATAAT (配列番号20)
pKF19GDH1	TGGTCATatctgtgcgacgtgcTATAAT (配列番号21)

* Chem., 48, 2901-2903 (1984) 由来の複製起点を導入した。具体的には、前述のpHK4を制限酵素BamHIおよびKpnIで消化して、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片を平滑末端化した後、SalIリソマリ (宝酒造) を用いてpHS399GDHのSalI部位に挿入した。本プラスミドをpGDHと名付けた。

【0095】L-グルタミン生産菌プレビバクテリウム・ラバムAJ12418株をpGDHで形質転換し、形質転換体を得た。得られた形質転換体AJ12418/pGDHを用いて、L

10 グルタミン生産のための培養を実施例1記載の方法で行った。その結果を表3に示した。GDH増強株ではL-グルタミンの収量が減少し、L-グルタミン酸の副生が増加したが、培養時間は大幅に短縮された。

【0096】

【表3】

※を得た。

【0099】形質転換体よりプラスミドを抽出し、gdhプロモーター領域の配列を決定した。このうち、表4に示す配列を有していたものを、pKF19GDH1、pKF19GDH4と命名した。gdhプロモーター配列をpKF19GDH1型に置換することにより、GDH活性は野生型のプロモーターを有するgdhに比べ約3倍、pKF19GDH4型に置換することによりGDH活性は約5倍向上させることができると予想される (国際公開W000/18935参照)。

【0100】これらのプラスミドを制限酵素SacIで切断し、gdhプロモーターおよびgdh遺伝子の部分断片を含むDNA断片を取得し、pSFKT2 (特開2000-262288号公報参照) のSacI部位に挿入した。これらのプラスミドを、それぞれpSFKTGDH1、pSFKTGDH4と名付けた。pSFKT2は、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株由来のプラスミドpAM330の誘導体であり、コリネ型細菌中での自律複製が温度感受性となっているプラスミドである。

【0101】

【表4】

pKF19GDI4

TTGCCAatatctgtgcgacgctgtATAAT (配列番号22)

【0102】(2) gdhプロモーター変異の染色体への導入

染色体上の gdh プロモーター配列への変異の導入は、以下のようにして行った。まず、QA-1 株を電気パルス法によりプラスミド pSFKTGDI1、pSFKTGDI4 で形質転換し、それぞれ形質転換体を得た。なお、形質転換後の培養は 25 °C で行った。次に、これらの形質転換体を 34 °C で培養し、34 °C においてカナマイシン耐性を示す株を選択した。上記プラスミドは 34 °C では自己複製できないために、相同組換えにより、染色体にこれらのプラスミドが組み込まれたもののみが、カナマイシン耐性を示す。さらに、これらのプラスミドが染色体上に組み込まれた株をカナマイシン非存在下で培養し、カナマイシン感受性となった株を選択し、そのうち染色体上の gdh プロモーター領域に pSFKTGDI1、pSFKTGDI4 と同じ変異が導入された株をそれぞれ QB-1、QB-4 と命名した。

【0103】(3) gdh 遺伝子增幅株の構築と GDI 活性の測定

L-グルタミン生産菌ブレビバクテリウム・フラバム QA-1 株を、実施例 3 (2) 記載のプラスミド pGDI で形質転換し、形質転換体を得た。得られた形質転換体 QA-1/pGDI を用いて L-グルタミン生産のための培養を実施例 1 *

* 記載の方法で行った。また、GDI 活性については Mol. Microbiology, 317-326(6) 1992 を参考とし、Tris-HCl(pH 7.5) 100 mM, NH4Cl 20 mM, α-ケトグルタル酸 10 mM, NADPH 0.25 mM を含む溶液に粗酵素液を加え、340 nm における吸光度の変化を測定することによって測定した。粗酵素液は、上記の培養液より遠心分離により菌体を分離し、Tris-HCl(pH 7.5) 100 mM で洗浄後、超音波破碎し、未破碎

10 菌体を遠心分離で除去することにより調製した。粗酵素液のたん白質濃度は牛血清アルブミンを標準試料として、Protein Assay (Bio-Rad) を用いて定量した。その結果を表 5 に示した。

【0104】L-グルタミンの収量においては、GDI プロモーター変異株 QB-1、QB-4 が高い収量を示した。また、QA-1/pGDI 株も、AJ12418 株よりも高い収量を示した。培養時間は、QA-1/pGDI 株が最も短かった。L-グルタミン酸の副生は、QB-1、QB-4 株が大幅に改善された。これらの結果から、GS と GDI を同時に強化することが、L-グルタミンの収量の向上および培養時間短縮に有効であることが示された。

【0105】

【表 5】

表 5

菌株	L-Gln(g/L)	L-Glu(g/L)	培養時間(hr)	GDI 活性(U/mg)
AJ12418	40.5	0.8	68	1.6
QA-1/pGDI	47.9	1.0	60	15.2
QB-1	50.5	0.1	65	4.1
QB-4	50.0	0.3	65	9.6

【0106】

【実施例 5】GS のアイソザイムをコードする遺伝子の取得

コリネバクテリウム・ダルタミカムの glnA を取得したことを報告した論文 (FEMS Microbiol. Letter, 154 (1997) 81-88) には、Δ glnA 破壊株がグルタミン要求となり、GS 活性が失われることを記載している一方、サザンブロッティングの結果、アイソザイムの存在を示唆するデータも報告されている。また、「アミノ酸発酵：学会出版センター、232 頁～235 頁」には、コリネバクテリウム・ダルタミカムには 2 種類の GS があることが記載されている。そこで第 2 の GS アイソザイムをコードする遺伝子の取得を試みた。

(1) プローブの調製

GS のアイソザイムをコードする遺伝子 (glnA2) は、コロニーハイブリダイゼーションにより取得した。まず、配列番号 18 および 19 に示すプライマーを用い

て、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 株の染色体 DNA を鑄型として PCR を行い、glnA 遺伝子部分断片を取得した。この DNA 断片を DIG-ハイプライム DNA ラベリング & デテクションスターーキット I (ペーリング・マンハイム) を用いて標識し、プローブとした。

40 【0107】(2) コロニーハイブリダイゼーション
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 株の染色体 DNA を抽出し、制限酵素 Sau3AI により部分分解して、得られた DNA 断片を pHS299 のベクターの BamHI 部位に挿入し大腸菌 JM109 株を形質転換した。得られた形質転換体を、Hybond-N+ (アマシャムファルマシアバイオテク) にトランスファーし、変性、中和後、DIG-ハイプライム DNA ラベリング & デテクションスターーキット I にしたがって、実施例 5 (1) で調製したプローブとハイブリダイズさせた。このとき、強くハイブリダイズする形質転換体と弱くハイブリダイズする形質

転換体が認められた。これらの形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、挿入断片の塩基配列を決定したところ、既知のコリネ型細菌のグルタミンシンターゼと高い相同意を示す遺伝子を含むクローニングが取得できた。後者の挿入断片の全塩基配列を配列表配列番号1に示した。

【0108】オープン・リーディング・フレームを推定し、その塩基配列より推定される産物のアミノ酸配列を配列表配列番号2と3に示した。これらのアミノ酸配列おののについて既知の配列と相同意比較を行った。用いたデータベースはGenbankである。その結果、いずれのオープン・リーディング・フレームにコードされるアミノ酸配列も、コリネ型細菌の新規なたんぱく質であることが明らかとなった。塩基配列及びアミノ酸配列は、Genetyx-Mac computer program (ソフトウェア開発、東京)により解析した。相同意解析は、LipmanとPearson (Science, 227, 1435-1441, 1985)の方法にしたがって行った。

【0109】配列表配列番号2に示したアミノ酸配列は、既に報告されているコリネバクテリウム・グルタミ²⁰

表6

菌株	遺伝子名	アミノ酸数	相同意
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	glnA2	446A.A	--.
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	glnA	478A.A	34.6%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	glnA2	446A.A	65.6%
<i>Streptomyces coelicolor</i>	glnA	453A.A	60.0%

【0112】

※30※【表7】

表7

菌株	遺伝子名	アミノ酸数	相同意
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	glnE	1045A.A	--.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	glnE	994A.A	51.9%
<i>Streptomyces coelicolor</i>	glnE	784A.A	33.4%

【0113】

【実施例6】ATase欠損株によるL-グルタミンの生産上記実施例5でATaseをコードする遺伝子glnEが明らかにされたので、L-グルタミン生産菌AJ12418よりglnE欠損株を構築した。具体的方法を以下に示す。まず、ブレビバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型として、配列番号23と24の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、glnE遺伝子の部分断片を得た。生成したPCR産物を常法により精製後、平滑末端化し、pHS6299(宝酒造)のHincII部位に挿入した。このプラスミドをpGLNEと名付けた。次に、このプラスミド上のglnE遺伝子の一部領域を欠失させる為、pGLNEをHincIIで消

化した後、セルフライゲーションを行い、得られたプラスミドをpΔGLNEと名付けた。このプラスミドは、配列表配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号2341番目から4650番目までを含んでいるが、3343番目のHincII認識部位から3659番目のHincII認識部位までの約300bpを欠失している。

【0114】上述のpΔGLNEは、コリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まない為、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが、本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた形が形質転換体として出現する。

【0115】L-グルタミン生産菌ブレビバクテリウム

*カムのGS (FEMS Microbiology Letters 81-88, (154) 1997)、マイコバクテリウム・ツバクロシスのGS (GenBank ACCESSION Z70692) およびストレプトマイセス・セリカラーのGS (GenBank ACCESSION AI136500) と、それぞれ34.6%、65.6%、60%の相同意を示し(表6)、コリネ型細菌のGSのアイソザイムであることが判明した。

【0110】一方、配列表配列番号3の配列は、既に報告されているマイコバクテリウム・ツバクロシスのATase (GenBank ACCESSION Z70692) およびストレプトマイセス・セリカラーのATase (GenBank ACCESSION Y17736) と、それぞれ51.9%、33.4%の相同意を示し(表7)、コリネ型細菌のATaseであることが判明した。したがって、配列番号1に示す塩基配列のうち、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードするオープン・リーディング・フレームはglnA2であり、配列番号3に示すアミノ酸配列をコードするオープン・リーディング・フレームはglnEであることが判明した。

【0111】

【表6】

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

10

・フラバムAJ12418を電気パルス法により、高濃度のプラスミドpΔGLNEを用いて形質転換し、カナマイシン耐性を指標として形質転換体を取得した。次にこれらの形質転換体を継代培養し、カナマイシン感受性となった株を取得した。取得したカナマイシン感受性株より染色体DNAを抽出し、これを錠型として配列番号23と24の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、glnE遺伝子の部分断片を得た。PCR産物をHincIIで消化し、約300bpの断片が生じないものをglnE遺伝子破壊株とした。この株をQA-Tと名付けた。AJ12418及びQA-Tを用いて、L-グル

表8

菌株	L-Gln(g/L)	GS活性(U/mg)	培養時間(hr)
AJ12418	39.0	0.03	70
QA-T	45.1	0.05	75

【0118】〔配列表の説明〕

配列番号1:glnA2およびglnE塩基配列

配列番号2:glnA2アミノ酸配列

配列番号3:glnEアミノ酸配列

配列番号4:glnA增幅用プライマーN

配列番号5:glnA增幅用プライマーC

配列番号6:glnA 1stPCRプライマーNN

配列番号7:glnA 1stPCRプライマーNC

配列番号8:glnA 1stPCRプライマーCN

配列番号9:glnA 1stPCRプライマーCC

配列番号10:glnA 2ndPCRプライマーN

配列番号11:glnA 2ndPCRプライマーC

配列番号12:gdh增幅用プライマーN

配列番号13:gdh增幅用プライマーC

配列番号14:gdh增幅用プライマーN2

配列番号15:gdh增幅用プライマーC2

配列番号16:gdhプロモーター変異プライマーM1

* タミン生産の為の培養を実施例1(3)記載の方法と同様にして行った。その結果を表8に示した。

【0116】QA-T株ではAJ12418株に比べ、L-グルタミン蓄積の向上が認められた。これらの株のGS活性について測定した結果についても表8に示した。QA-T株ではAJ12418株に比べ、GS活性が向上していることが確認された。

【0117】

【表8】

※配列番号17:gdhプロモーター変異プライマーM4

配列番号18:glnAプローブ調製用プライマーN

20 配列番号19:glnAプローブ調製用プライマーC

配列番号20:野生型gdhプロモーター配列

配列番号21:変異型gdhプロモーター配列

配列番号22:変異型gdhプロモーター配列

配列番号23:glnE破壊用プライマーN

配列番号24:glnE破壊用プライマーC

【0119】

【発明の効果】本発明によれば、コリネ型細菌を用いた発酵法によるL-グルタミンの製造において、L-グルタミン酸の副生を抑制でき、L-グルタミンの生産効率を向上させることができる。また、本発明のDNAは、コリネ型細菌のL-グルタミン生産菌の育種に利用することができる。

【0120】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> 発酵法によるL-グルタミンの製造法及びL-グルタミン生産菌

<130> P-8706

<140>

<141> 2001-05-30

<150> JP 2001-28163

<151> 2001-02-05

<160> 24

<170> PatentIn version 3.0

【0121】

<210> 1

<211> 5500

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

(16)

特開2002-300887

			30
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(659)..(1996)		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(2006)..(5200)		
<400>	1		
gatcagtgt tcggcttctt ctgcgaagtt ggtggactct gccttttca aaagtgcgggt			60
gatacgaiga tgccgttgg ctgtgcggg ggtcatgtgg ctgggtgtctt gatgtctaa			120
ggcgtggcgc tctgcgagca ttgcccagtc aggcaaggta cttagcttcg gtagctcggt			180
gagaatcttc tccagggtca tcacccggcaa gtggctagtt tcggccgcac gcgttccgtt			240
cacccacagt gtgtacatct catcgagca ggagtaaggta atctcaggta gcgcgtgaaa			300
caggagtggta tcaatatccg cggaaaactc atggcggaga tcggccggag tccacccacg			360
aagcgcacag aaaccttagt ggctgtatgtatgc llllllll aaaaactgtac ggttaagagtc			420
lllgcgtcg gtgacgttgtt cggagaaglg ggagagggtc attgcggttt ctttattcgt			480
aggagaggttc taatttcggt gcggttctca gtgaaccacc caagcggac acctccacc			540
cccggtgtcat caaaaaacccg cgacatctt gagtaactct gagaaaaaact acccccgatg			600
cgagtataaaa agtggcaaat ggcgcgtcga tgtcccatcg ctgcgttagat tagttttc			658
atg aac agc gaa cag gaa ttt gta ctc agc gcc att gaa gaa cgc gac			706
Net Asn Ser Glu Gln Glu Phe Val Leu Ser Ala Ile Glu Glu Arg Asp			
1 5 10 15			
att aag ttt gtg cgt cta tgg ttc act gac att ctt gga cac ttg aag			754
Ile Lys Phe Val Arg Leu Trp Phe Thr Asp Ile Leu Gly His Leu Lys			
20 25 30			
tca gtg gtt gtg gct ect gca gaa cta gag tct gcg ttg gaa gaa ggc			802
Ser Val Val Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ala Leu Glu Glu Gly			
35 40 45			
atc gga ttc gat ggc tca gcc att gag ggc tac gcg cgt atc tcg gaa			850
Ile Gly Phe Asp Gly Ser Ala Ile Glu Gly Tyr Ala Arg Ile Ser Glu			
50 55 60			
gcg gac acc att gcc cgc cca gat cca tcg aca ttc cag gtc ctc cca			898
Ala Asp Thr Ile Ala Arg Pro Asp Pro Ser Thr Phe Gln Val Leu Pro			
65 70 75 80			
cta gaa gcg ggc atc tca aaa ctg cag gca gca cgc ctg ttt tgc gat			946
Leu Glu Ala Gly Ile Ser Lys Leu Gln Ala Ala Arg Leu Phe Cys Asp			
85 90 95			
gtc acg atg ccc gac gga cag cca tct ttt tct gac ccg cgc caa gtg			994
Val Thr Met Pro Asp Gly Gln Pro Ser Phe Ser Asp Pro Arg Gln Val			
100 105 110			
ctg cgc agg cag gtc caa cta gct gca gat gaa ggc ttg acc tgc atg			1042
Leu Arg Arg Gln Val Gln Leu Ala Ala Asp Glu Gly Leu Thr Cys Met			
115 120 125			
atc tca cca gag att gag ttc tat ttg gtg caa agc ctt cgc acc aac			1090
Ile Ser Pro Glu Ile Glu Phe Tyr Leu Val Gln Ser Leu Arg Thr Asn			
130 135 140			
gga ctg cca cct gtg ccc act gac aac ggc gga tat ttc gac caa gcc			1138
Gly Leu Pro Pro Val Pro Thr Asp Asn Gly Gly Tyr Phe Asp Gln Ala			
145 150 155 160			
aca ttc aat gag ggc ccg aat ttc cgt cga aac ggc atg gta ggc ctg			1186
Thr Phe Asn Glu Ala Pro Asn Phe Arg Arg Asn Ala Met Val Ala Leu			

31

32

165	170	175	
gag gaa ctc ggc atc cct gtc gag ttc tcc cac cat gaa act gca cct			1234
Glu Glu Leu Gly Ile Pro Val Glu Phe Ser His His Glu Thr Ala Pro			
180	185	190	
ggc cag caa gaa atc gat tta cgc cat gcg gat ggc ctc acc atg gcc			1282
Gly Gln Gln Glu Ile Asp Leu Arg His Ala Asp Ala Leu Thr Met Ala			
195	200	205	
gac aac atc atg acc ttc cgc tac atc atg aaa cag gtg gca agg gac			1330
Asp Asn Ile Met Thr Phe Arg Tyr Ile Met Lys Gln Val Ala Arg Asp			
210	215	220	
caa ggc gtt ggg gca tca ttt atg ccc aag cca ttc caa gaa cat gca			1378
Gln Gly Val Gly Ala Ser Phe Met Pro Lys Pro Phe Gln Glu His Ala			
225	230	235	240
ggc tcc gcc atg cac acg cac atg tcc tta ttt gag ggc gat acc aac			1426
Gly Ser Ala Met His Thr His Met Ser Leu Phe Glu Gly Asp Thr Asn			
245	250	255	
gcg ttc cac gat cca gac gat tct tac atg ctg tcc aaa acc gca aaa			1474
Ala Phe His Asp Pro Asp Asp Ser Tyr Met Leu Ser Lys Thr Ala Lys			
260	265	270	
cag ttc atc gct gga atc ttg cat cac gct cca gaa ttc acc get gtg			1522
Gln Phe Ile Ala Gly Ile Leu His His Ala Pro Glu Phe Thr Ala Val			
275	280	285	
acc aac cag tgg gtc aat tcc tac aaa cgc atc gtg tac gga aac gaa			1570
Thr Asn Gln Trp Val Asn Ser Tyr Lys Arg Ile Val Tyr Gly Asn Glu			
290	295	300	
gct cca act ggg gca acc tgg ggt gta tct aat cgt tct gct ctg gtt			1618
Ala Pro Thr Ala Ala Thr Trp Gly Val Ser Asn Arg Ser Ala Leu Val			
305	310	315	320
cgt gtt cct acc tac cgt ttg aat aag gag gag tgg cgc cgg gtt gag			1666
Arg Val Pro Thr Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu Ser Arg Arg Val Glu			
325	330	335	
gtg cgt ctt cct gat acc get tgg aac cca tat ttg gct ttt tca gtc			1714
Val Arg Leu Pro Asp Thr Ala Cys Asn Pro Tyr Leu Ala Phe Ser Val			
340	345	350	
atg ctc ggc get ggt ttg aaa ggt att aaa gaa ggt tat gag ctc gac			1762
Met Leu Gly Ala Gly Leu Lys Gly Ile Lys Glu Gly Tyr Glu Leu Asp			
355	360	365	
gag cca gct gag gac gat atc tcc aac ttg agc ttc cgg gaa cgt cgc			1810
Glu Pro Ala Glu Asp Asp Ile Ser Asn Leu Ser Phe Arg Glu Arg Arg			
370	375	380	
gcc atg ggc tac aac gat ctg cca aac agc ctt gat cag gca ctg cgc			1858
Ala Met Gly Tyr Asn Asp Ile Pro Asn Ser Leu Asp Gln Ala Leu Arg			
385	390	395	400
caa atg gaa aag tca gag ctt gtt gct gac atc ctc ggt gag cac gtt			1906
Gln Met Glu Lys Ser Glu Leu Val Ala Asp Ile Leu Gly Glu His Val			
405	410	415	
ttt gag ttt ttc ttg cgc aat aag tgg cgt gaa tgg cgt gac tac caa			1954
Phe Glu Phe Phe Leu Arg Asn Lys Trp Arg Glu Trp Arg Asp Tyr Gln			
420	425	430	
gag cag atc act ccc tgg gag ctc cga aac aat ctt gat tac tagacttt			2005

33

34

Glu Gln Ile Thr Pro Trp Glu Leu Arg Asn Asn Leu Asp Tyr
 435 440 445
 gcactccaaat ggaacccta cggcaccctt attgcgaccc gataaaggag gggagaagct 2065
 atg tca gga ccg tta aga agt gaa cgt aaa gtc gtt ggc ttt gtc aga 2113
 Met Ser Gly Pro Leu Arg Ser Glu Arg Lys Val Val Gly Phe Val Arg
 1 5 10 15
 gac cca ctg cca aaa gtt ggt tct tta tcg ctg aaa tct gag cat gcc 2161
 Asp Pro Leu Pro Lys Val Gly Ser Leu Ser Leu Lys Ser Glu His Ala
 20 25 30
 caa gca gat cta gag cat ttg ggt tgg cgc aat gtt gag tct tgg gat 2209
 Gln Ala Asp Leu Glu His Leu Gly Trp Arg Asn Val Glu Ser Leu Asp
 35 40 45
 ttg ttg tgg ggc ttg tca ggt gca ggc gat ccc gat gtc ggc ctg aac 2257
 Leu Leu Trp Gly Leu Ser Gly Ala Gly Asp Pro Asp Val Ala Leu Asn
 50 55 60
 ctt ctt att cgg ctg tat cag gca ctt gaa gca atc ggc gag gat gct 2305
 Leu Leu Ile Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Glu Ala Ile Gly Glu Asp Ala
 65 70 75 80
 cga aac gag ctt gat caa gag att cgc cag gat gaa gaa cta cga gtc 2353
 Arg Asn Glu Leu Asp Gln Glu Ile Arg Gln Asp Glu Glu Leu Arg Val
 85 90 95
 cgc ctt ttt gca ttg ttg ggt ggt tcc tcg gct gtc ggt gat cac ttg 2401
 Arg Leu Phe Ala Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ala Val Glu Asp His Leu
 100 105 110
 gtc gcc aat cct ttg cag tgg aaa ctc tta aaa ctt gat ggc cca tcg 2449
 Val Ala Asn Pro Leu Gln Trp Lys Leu Leu Lys Leu Asp Ala Pro Ser
 115 120 125
 agg gaa gag atg ttt cag gcg ctg ctg gaa tct gtg aaa gct cag cct 2497
 Arg Glu Glu Met Phe Gln Ala Leu Leu Glu Ser Val Lys Ala Gln Pro
 130 135 140
 gct gtg ctt gag gtt gag gat ttc agc gat gca cac aac att gcc cga 2545
 Ala Val Leu Glu Val Glu Asp Phe Ser Asp Ala His Asn Ile Ala Arg
 145 150 155 160
 gac gat ttg agc acg cct ggt ttt tac acg gct agt gtt acc ggg cct 2593
 Asp Asp Leu Ser Thr Pro Gly Phe Tyr Thr Ala Ser Val Thr Gly Pro
 165 170 175
 gaa gca gag cga gtc ttg aaa tgg act tat cgc acg ttg ctg acc cgg 2641
 Glu Ala Glu Arg Val Leu Lys Trp Thr Tyr Arg Thr Leu Leu Thr Arg
 180 185 190
 att gct gcg cat gat tta gcg ggt acc tat ccc acc gac atg cgg aga 2689
 Ile Ala Ala His Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Pro Thr Asp Met Arg Arg
 195 200 205
 aaa ggt ggc gat cct gtt ccg ttt agc aca gtg acc atg cag ctc agc 2737
 Lys Gly Gly Asp Pro Val Pro Phe Ser Thr Val Thr Met Gln Leu Ser
 210 215 220
 gac cta gct gat gct gct ttg act gct gct tta gct gtg gca att gcc 2785
 Asp Leu Ala Asp Ala Ala Leu Thr Ala Ala Leu Ala Val Ala Ile Ala
 225 230 235 240
 aat gtt tat ggt gaa aag ccg gtt gat tca gct tta tct gtc atc gcg 2833
 Asn Val Tyr Gly Glu Lys Pro Val Asp Ser Ala Leu Ser Val Ile Ala

35

36

245	250	255	
atg ggc aaa tgt ggc gcg cag gaa ttg aac tac att tca gat gtg gac			2881
Met Gly Lys Cys Gly Ala Gln Glu Leu Asn Tyr Ile Ser Asp Val Asp			
260	265	270	
gtg gtg ttt gtt gca gag ccg gca aac tct aaa tca aca cgc acc gca			2929
Val Val Phe Val Ala Glu Pro Ala Asn Ser Lys Ser Thr Arg Thr Ala			
275	280	285	
gca gag ctc att cgc atc ggt aac tgc ttc ttt gag gtg gat gca			2977
Ala Glu Leu Ile Arg Ile Gly Ser Asn Ser Phe Phe Glu Val Asp Ala			
290	295	300	
gca ctt cgc cca gaa ggt aaa agt ggc gct ctt gtg cgc tct ttg gat			3025
Ala Leu Arg Pro Glu Gly Lys Ser Gly Ala Leu Val Arg Ser Leu Asp			
305	310	315	320
tcc cat atg gcg tat tac aag cgc tgg gcg gaa acc tgg gaa ttt cag			3073
Ser His Met Ala Tyr Tyr Lys Arg Trp Ala Glu Thr Trp Glu Phe Gln			
325	330	335	
gca ctg ctg aaa gct cgt ccc atg acg ggt gat att gac ctt ggg cag			3121
Ala Leu Leu Lys Ala Arg Pro Met Thr Gly Asp Ile Asp Leu Gly Gln			
340	345	350	
tcc tat gtg gat gct ctt tca ccg ttg att tgg gcg gct agc cag cgg			3169
Ser Tyr Val Asp Ala Leu Ser Pro Leu Ile Trp Ala Ala Ser Gln Arg			
355	360	365	
gaa tca ttt gtc aca gat gtc caa gct atg cgc cgt cga gtg ttg gac			3217
Glu Ser Phe Val Thr Asp Val Gln Ala Met Arg Arg Arg Val Leu Asp			
370	375	380	
aat gtt ccg gaa gac ttg cgt gat cgt gag ctg aag ctt ggt cgc ggt			3265
Asn Val Pro Glu Asp Leu Arg Asp Arg Glu Leu Lys Leu Gly Arg Gly			
385	390	395	400
ggt ttg agg gat gtg gag ttt gct gtc cag ctc ctt cag atg gtc cat			3313
Gly Leu Arg Asp Val Glu Phe Ala Val Gln Leu Leu Gln Met Val His			
405	410	415	
ggt cgc att gat gag acg ttg cgg gtt cgg tca acg gta aat gct ttg			3361
Gly Arg Ile Asp Glu Thr Leu Arg Val Arg Ser Thr Val Asn Ala Leu			
420	425	430	
cat gtg ttg gtt gat cag gga tat gtg ggt cgt gaa gac ggg cat aat			3409
His Val Leu Val Asp Gln Gly Tyr Val Gly Arg Glu Asp Gly His Asn			
435	440	445	
ctc att gag tcg tat gag ttt ttg cgc ctg ttg gag cat cgc ctt caa			3457
Leu Ile Glu Ser Tyr Glu Phe Leu Arg Leu Leu Glu His Arg Leu Gln			
450	455	460	
ttg gag cgg atc aag cgc act cac ttg tta ccg aaa cct gat gac cga			3505
Leu Glu Arg Ile Lys Arg Thr His Leu Leu Pro Lys Pro Asp Asp Arg			
465	470	475	480
atg aat atg cgc tgg ttg gcg cgc gct tct ggg ttt act ggt tcg atg			3553
Met Asn Met Arg Trp Leu Ala Arg Ala Ser Gly Phe Thr Gly Ser Met			
485	490	495	
gag caa agt tcg gcc aaa gct atg gaa cgg cat ttg cgt aag gtt cgt			3601
Glu Gln Ser Ser Ala Lys Ala Met Glu Arg His Leu Arg Lys Val Arg			
500	505	510	
ttg cag att cag tcg ttg cat agt cag ctg ttt tat cgg cca ctg ctg			3649

Leu Gln Ile Gln Ser Leu His Ser Gln Leu Phe Tyr Arg Pro Leu Leu
 515 520 525 3697
 aac tct gtg gtc aac ttg agc gcg gat gcc atc aga ttg tct ccg gat
 Asn Ser Val Val Asn Leu Ser Ala Asp Ala Ile Arg Leu Ser Pro Asp
 530 535 540 3745
 Ala Ala Lys Leu Gln Leu Gly Ala Leu Gly Tyr Leu His Pro Ser Arg
 545 550 555 560 3793
 gct tat gaa cac ctg act gct ctt gca tca gga gct agc cgt aaa gcc
 Ala Tyr Glu His Leu Thr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Ser Arg Lys Ala
 565 570 575 3841
 aag att cag gcg atg ttg ctg ccc acg ttg atg gag tgg ctg tct caa
 Lys Ile Gln Ala Met Leu Leu Pro Thr Leu Met Glu Trp Leu Ser Gln
 580 585 590 3889
 aca gct gaa cca gat gcg gga ttg ctg aat tac cgc aag ctt tct gat
 Thr Ala Glu Pro Asp Ala Gly Leu Leu Asn Tyr Arg Lys Leu Ser Asp
 595 600 605 3937
 gct tcc tat gat cgc agc tgg ttt ttg cgc atg ctg cgt gat gag ggc
 Ala Ser Tyr Asp Arg Ser Trp Phe Leu Arg Met Leu Arg Asp Glu Gly
 610 615 620 3985
 gta gtg ggg cag cgg ttg atg cgt att ttg gga aat tct ccc tat att
 Val Val Gly Gln Arg Leu Met Arg Ile Leu Gly Asn Ser Pro Tyr Ile
 625 630 635 640 4033
 tct gaa ctg att atc tcc act ccg gac ttt gtg aaa cag ctg ggt gat
 Ser Glu Leu Ile Ile Ser Thr Pro Asp Phe Val Lys Gln Leu Gly Asp
 645 650 655 4081
 gcg gcg tct ggt cct aaa ttg ctt gct act gca ccg act cag gtt gtg
 Ala Ala Ser Gly Pro Lys Leu Leu Ala Thr Ala Pro Thr Gln Val Val
 660 665 670 4129
 aaa gca atc aag gcg acg gtg tcg cgt cat gag tca cct gat cgg gcg
 Lys Ala Ile Lys Ala Thr Val Ser Arg His Glu Ser Pro Asp Arg Ala
 675 680 685 4177
 atc cag gct gca cga tcg ctg agg agg cag gag ctg gca cgc att gcc
 Ile Gln Ala Ala Arg Ser Leu Arg Arg Gln Glu Leu Ala Arg Ile Ala
 690 695 700 4225
 tct gct gat ttg ctc aac atg ctc act gtt cag gaa gta tgc caa agc
 Ser Ala Asp Leu Leu Asn Met Leu Thr Val Gln Glu Val Cys Gln Ser
 705 710 715 720 4273
 ttg tca cta gtc tgg gat gcg gtg ttg gat gct gcc ttg gat gcg gaa
 Leu Ser Leu Val Trp Asp Ala Val Leu Asp Ala Ala Leu Asp Ala Glu
 725 730 735 4321
 atc cgt gct gca ctt aac gat cca cag aaa cca gat cag cct ctg gcc
 Ile Arg Ala Ala Leu Asn Asp Pro Gln Lys Pro Asp Gln Pro Leu Ala
 740 745 750 4369
 aat att tct gtg atc ggc atg ggc cgt ttg ggt gga gca gaa ctt gga
 Asn Ile Ser Val Ile Gly Met Gly Arg Leu Gly Gly Ala Glu Leu Gly
 755 760 765 4417
 tac ggt tct gat gcc gat gtg atg ttt gta tgc gag ccg gta gcc ggt
 Tyr Gly Ser Asp Ala Asp Val Met Phe Val Cys Glu Pro Val Ala Gly
 770 775 780

39

40

gtg gaa gag cat gag gcc gtc aca tgg tct att gcg atc tgt gat tcc 4465
 Val Glu Glu His Glu Ala Val Thr Trp Ser Ile Ala Ile Cys Asp Ser
 785 790 795 800
 atg cgg tcg agg ctt gcg cag cct tcc ggt gat cca cct ttg gag gtg 4513
 Met Arg Ser Arg Leu Ala Gln Pro Ser Gly Asp Pro Pro Leu Glu Val
 805 810 815
 gat ctg ggg ctg cgt cct gaa ggg aga tct ggt gcg att gtg cgc acc 4561
 Asp Leu Gly Leu Arg Pro Glu Gly Arg Ser Gly Ala Ile Val Arg Thr
 820 825 830
 gtt gat tcc tat gtg aag tac tac gaa aag tgg ggt gaa act tgg gag 4609
 Val Asp Ser Tyr Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Trp Gly Glu Thr Trp Glu
 835 840 845
 att cag gcg ctg ctg agg gct gcg tgg gtt gct ggt gat cgt gag ctg 4657
 Ile Gln Ala Leu Leu Arg Ala Ala Trp Val Ala Gly Asp Arg Glu Leu
 850 855 860
 ggc att aag ttc ttg gag tcg att gat cgt ttc cgc tac cca gtt gac 4705
 Gly Ile Lys Phe Leu Glu Ser Ile Asp Arg Phe Arg Tyr Pro Val Asp
 865 870 875 880
 ggg gca acg cag gcg cag ctt cgt gaa gtt cgt cga att aag gcg agg 4753
 Gly Ala Thr Gln Ala Gln Leu Arg Glu Val Arg Arg Ile Lys Ala Arg
 885 890 895
 gtg gat aat gag agg ctt ccg cgc ggg gct gat cga aat acc cat acc 4801
 Val Asp Asn Glu Arg Leu Pro Arg Gly Ala Asp Arg Asn Thr His Thr
 900 905 910
 aag ctg ggt cgg gga gcg tta act gac atc gag tgg act gtg cag ttg 4849
 Lys Leu Gly Arg Gly Ala Leu Thr Asp Ile Glu Trp Thr Val Gln Leu
 915 920 925
 ttg acc atg atg cat gct cat gag att ccg gag ctg cac aat acg tcg 4897
 Leu Thr Met Met His Ala His Glu Ile Pro Glu Leu His Asn Thr Ser
 930 935 940
 acg ttg gaa gtt ctt gaa gtg ctg gaa aag cat cag att att aac cct 4945
 Thr Leu Glu Val Leu Glu Val Leu Glu Lys His Gln Ile Ile Asn Pro
 945 950 955 960
 gtg cag gtg cag acg ctt ccg gaa gcg tgg ctg acg gca acg gct gct 4993
 Val Gln Val Gln Thr Leu Arg Glu Ala Trp Leu Thr Ala Thr Ala Ala
 965 970 975
 agg aat gcg ctt gtg ctg gtc agg ggt aag aga tta gat cag tta cct 5041
 Arg Asn Ala Leu Val Leu Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gln Leu Pro
 980 985 990
 act cct ggt ccg cac ctt gcg cag gtg gct ggt gcg tct ggt tgg gat 5089
 Thr Pro Gly Pro His Leu Ala Gln Val Ala Gly Ala Ser Gly Trp Asp
 995 1000 1005
 cca aat gag tac cag gag tat ttg gaa aac tat ctg aaa gtg acc agg 5137
 Pro Asn Glu Tyr Gln Glu Tyr Leu Glu Asn Tyr Leu Lys Val Thr Arg
 1010 1015 1020
 aag agt cgt cag gtt gtt gat gaa gtc ttc tgg ggt gtg gac tct atg 5185
 Lys Ser Arg Gln Val Val Asp Glu Val Phe Trp Gly Val Asp Ser Met
 1025 1030 1035 1040
 gag caa cgt gag ttt tagtaggtg gtggagccc caaaggcgtc gaaaattgtt c 5241
 Glu Gln Arg Glu Phe

1045

caactaaggg	actataatgt	ggtgtggata	acctaagtta	atctttgt	agcgtgagga	5301
tttctctgag	gaatctagac	gcagattaac	tccgcgttgg	cagcgaccgg	gataacacccg	5361
cgggttgcggc	cacgcaggt	cacaaaggac	accactatgt	caagcattat	tgcaagecaac	5421
agcgaccta	cggaggagct	ggcgcacccac	actgcgcggg	cacatgaaga	ggcccgagcac	5481
tcaacgttta	tgaatgtac					5500

[0122]

<210> 2
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Brevibacterium lactofermentum*
 <400> 2
 Met Asn Ser Glu Gln Glu Phe Val Leu Ser Ala Ile Glu Glu Arg Asp
 1 5 10 15
 Ile Lys Phe Val Arg Leu Trp Phe Thr Asp Ile Leu Gly His Leu Lys
 20 25 30
 Ser Val Val Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ala Leu Glu Glu Gly
 35 40 45
 Ile Gly Phe Asp Gly Ser Ala Ile Glu Gly Tyr Ala Arg Ile Ser Glu
 50 55 60
 Ala Asp Thr Ile Ala Arg Pro Asp Pro Ser Thr Phe Gln Val Leu Pro
 65 70 75 80
 Leu Glu Ala Gly Ile Ser Lys Leu Gln Ala Ala Arg Leu Phe Cys Asp
 85 90 95
 Val Thr Met Pro Asp Gly Gln Pro Ser Phe Ser Asp Pro Arg Gln Val
 100 105 110
 Leu Arg Arg Gln Val Gln Leu Ala Ala Asp Glu Gly Leu Thr Cys Met
 115 120 125
 Ile Ser Pro Glu Ile Glu Phe Tyr Leu Val Gln Ser Leu Arg Thr Asn
 130 135 140
 Gly Leu Pro Pro Val Pro Thr Asp Asn Gly Gly Tyr Phe Asp Gln Ala
 145 150 155 160
 Thr Phe Asn Glu Ala Pro Asn Phe Arg Arg Asn Ala Met Val Ala Leu
 165 170 175
 Glu Glu Leu Gly Ile Pro Val Glu Phe Ser His His Glu Thr Ala Pro
 180 185 190
 Gly Gln Gln Glu Ile Asp Leu Arg His Ala Asp Ala Leu Thr Met Ala
 195 200 205
 Asp Asn Ile Met Thr Phe Arg Tyr Ile Met Lys Gln Val Ala Arg Asp
 210 215 220
 Gln Gly Val Gly Ala Ser Phe Met Pro Lys Pro Phe Gln Glu His Ala
 225 230 235 240
 Gly Ser Ala Met His Thr His Met Ser Leu Phe Glu Gly Asp Thr Asn
 245 250 255
 Ala Phe His Asp Pro Asp Asp Ser Tyr Met Leu Ser Lys Thr Ala Lys
 260 265 270
 Gln Phe Ile Ala Gly Ile Leu His His Ala Pro Glu Phe Thr Ala Val
 275 280 285
 Thr Asn Gln Trp Val Asn Ser Tyr Lys Arg Ile Val Tyr Gly Asn Glu
 290 295 300

43

44

Ala Pro Thr Ala Ala Thr Trp Gly Val Ser Asn Arg Ser Ala Leu Val
 305 310 315 320
 Arg Val Pro Thr Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu Ser Arg Arg Val Glu
 325 330 335
 Val Arg Leu Pro Asp Thr Ala Cys Asn Pro Tyr Leu Ala Phe Ser Val
 340 345 350
 Met Leu Gly Ala Gly Leu Lys Gly Ile Lys Glu Gly Tyr Glu Leu Asp
 355 360 365
 Glu Pro Ala Glu Asp Asp Ile Ser Asn Leu Ser Phe Arg Glu Arg Arg
 370 375 380
 Ala Met Gly Tyr Asn Asp Leu Pro Asn Ser Leu Asp Gln Ala Leu Arg
 385 390 395 400
 Gln Met Glu Lys Ser Glu Leu Val Ala Asp Ile Leu Gly Glu His Val
 405 410 415
 Phe Glu Phe Phe Leu Arg Asn Lys Trp Arg Glu Trp Arg Asp Tyr Gln
 420 425 430
 Glu Gln Ile Thr Pro Trp Glu Leu Arg Asn Asn Leu Asp Tyr
 435 440 445

【0123】

<210> 3
 <211> 1045
 <212> PRT
 <213> *Brevibacterium lactofermentum*
 <400> 3
 Met Ser Gly Pro Leu Arg Ser Glu Arg Lys Val Val Gly Phe Val Arg
 1 5 10 15
 Asp Pro Leu Pro Lys Val Gly Ser Leu Ser Leu Lys Ser Glu His Ala
 20 25 30
 Gln Ala Asp Leu Glu His Leu Gly Trp Arg Asn Val Glu Ser Leu Asp
 35 40 45
 Leu Leu Trp Gly Leu Ser Gly Ala Gly Asp Pro Asp Val Ala Leu Asn
 50 55 60
 Leu Leu Ile Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Glu Ala Ile Gly Glu Asp Ala
 65 70 75 80
 Arg Asn Glu Leu Asp Gln Glu Ile Arg Gln Asp Glu Glu Leu Arg Val
 85 90 95
 Arg Leu Phe Ala Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ala Val Gly Asp His Leu
 100 105 110
 Val Ala Asn Pro Leu Gln Trp Lys Leu Leu Lys Leu Asp Ala Pro Ser
 115 120 125
 Arg Glu Glu Met Phe Gln Ala Leu Leu Glu Ser Val Lys Ala Gln Pro
 130 135 140
 Ala Val Leu Glu Val Glu Asp Phe Ser Asp Ala His Asn Ile Ala Arg
 145 150 155 160
 Asp Asp Leu Ser Thr Pro Gly Phe Tyr Thr Ala Ser Val Thr Gly Pro
 165 170 175
 Glu Ala Glu Arg Val Leu Lys Trp Thr Tyr Arg Thr Leu Leu Thr Arg
 180 185 190
 Ile Ala Ala His Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Pro Thr Asp Met Arg Arg
 195 200 205

45

46

Lys Gly Gly Asp Pro Val Pro Phe Ser Thr Val Thr Met Gln Leu Ser
 210 215 220
 Asp Leu Ala Asp Ala Ala Leu Thr Ala Ala Leu Ala Val Ala Ile Ala
 225 230 235 240
 Asn Val Tyr Gly Glu Lys Pro Val Asp Ser Ala Leu Ser Val Ile Ala
 245 250 255
 Met Gly Lys Cys Gly Ala Gln Glu Leu Asn Tyr Ile Ser Asp Val Asp
 260 265 270
 Val Val Phe Val Ala Glu Pro Ala Asn Ser Lys Ser Thr Arg Thr Ala
 275 280 285
 Ala Glu Leu Ile Arg Ile Gly Ser Asn Ser Phe Phe Glu Val Asp Ala
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Glu Gly Lys Ser Gly Ala Leu Val Arg Ser Leu Asp
 305 310 315 320
 Ser His Met Ala Tyr Tyr Lys Arg Trp Ala Glu Thr Trp Glu Phe Gln
 325 330 335
 Ala Leu Leu Lys Ala Arg Pro Met Thr Gly Asp Ile Asp Leu Gly Gln
 340 345 350
 Ser Tyr Val Asp Ala Leu Ser Pro Leu Ile Trp Ala Ala Ser Gln Arg
 355 360 365
 Glu Ser Phe Val Thr Asp Val Gln Ala Met Arg Arg Arg Val Leu Asp
 370 375 380
 Asn Val Pro Glu Asp Leu Arg Asp Arg Glu Leu Lys Leu Gly Arg Gly
 385 390 395 400
 Gly Leu Arg Asp Val Glu Phe Ala Val Gln Leu Leu Gln Met Val His
 405 410 415
 Gly Arg Ile Asp Glu Thr Leu Arg Val Arg Ser Thr Val Asn Ala Leu
 420 425 430
 His Val Leu Val Asp Gln Gly Tyr Val Gly Arg Glu Asp Gly His Asn
 435 440 445
 Leu Ile Glu Ser Tyr Glu Phe Leu Arg Leu Leu Glu His Arg Leu Gln
 450 455 460
 Leu Glu Arg Ile Lys Arg Thr His Leu Leu Pro Lys Pro Asp Asp Arg
 465 470 475 480
 Met Asn Met Arg Trp Leu Ala Arg Ala Ser Gly Phe Thr Gly Ser Met
 485 490 495
 Glu Gln Ser Ser Ala Lys Ala Met Glu Arg His Leu Arg Lys Val Arg
 500 505 510
 Leu Gln Ile Gln Ser Leu His Ser Gln Leu Phe Tyr Arg Pro Leu Leu
 515 520 525
 Asn Ser Val Val Asn Leu Ser Ala Asp Ala Ile Arg Leu Ser Pro Asp
 530 535 540
 Ala Ala Lys Leu Gln Leu Gly Ala Leu Gly Tyr Leu His Pro Ser Arg
 545 550 555 560
 Ala Tyr Glu His Leu Thr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Ser Arg Lys Ala
 565 570 575
 Lys Ile Gln Ala Met Leu Leu Pro Thr Leu Met Glu Trp Leu Ser Gln
 580 585 590
 Thr Ala Glu Pro Asp Ala Gly Leu Leu Asn Tyr Arg Lys Leu Ser Asp
 595 600 605

Ala Ser Tyr Asp Arg Ser Trp Phe Leu Arg Met Leu Arg Asp Glu Gly
 610 615 620
 Val Val Gly Gln Arg Leu Met Arg Ile Leu Gly Asn Ser Pro Tyr Ile
 625 630 635 640
 Ser Glu Leu Ile Ile Ser Thr Pro Asp Phe Val Lys Gln Leu Gly Asp
 645 650 655
 Ala Ala Ser Gly Pro Lys Leu Leu Ala Thr Ala Pro Thr Gln Val Val
 660 665 670
 Lys Ala Ile Lys Ala Thr Val Ser Arg His Glu Ser Pro Asp Arg Ala
 675 680 685
 Ile Gln Ala Ala Arg Ser Leu Arg Arg Gln Glu Leu Ala Arg Ile Ala
 690 695 700
 Ser Ala Asp Leu Leu Asn Met Leu Thr Val Gln Glu Val Cys Gln Ser
 705 710 715 720
 Leu Ser Leu Val Trp Asp Ala Val Leu Asp Ala Ala Leu Asp Ala Glu
 725 730 735
 Ile Arg Ala Ala Leu Asn Asp Pro Gln Lys Pro Asp Gln Pro Leu Ala
 740 745 750
 Asn Ile Ser Val Ile Gly Met Gly Arg Leu Gly Gly Ala Glu Leu Gly
 755 760 765
 Tyr Gly Ser Asp Ala Asp Val Met Phe Val Cys Glu Pro Val Ala Gly
 770 775 780
 Val Glu Glu His Glu Ala Val Thr Trp Ser Ile Ala Ile Cys Asp Ser
 785 790 795 800
 Met Arg Ser Arg Leu Ala Gln Pro Ser Gly Asp Pro Pro Leu Glu Val
 805 810 815
 Asp Leu Gly Leu Arg Pro Glu Gly Arg Ser Gly Ala Ile Val Arg Thr
 820 825 830
 Val Asp Ser Tyr Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Trp Gly Glu Thr Trp Glu
 835 840 845
 Ile Gln Ala Leu Leu Arg Ala Ala Trp Val Ala Gly Asp Arg Glu Leu
 850 855 860
 Gly Ile Lys Phe Leu Glu Ser Ile Asp Arg Phe Arg Tyr Pro Val Asp
 865 870 875 880
 Gly Ala Thr Gln Ala Gln Leu Arg Glu Val Arg Arg Ile Lys Ala Arg
 885 890 895
 Val Asp Asn Glu Arg Leu Pro Arg Gly Ala Asp Arg Asn Thr His Thr
 900 905 910
 Lys Leu Gly Arg Gly Ala Leu Thr Asp Ile Glu Trp Thr Val Gln Leu
 915 920 925
 Leu Thr Met Met His Ala His Glu Ile Pro Glu Leu His Asn Thr Ser
 930 935 940
 Thr Leu Glu Val Leu Glu Val Leu Glu Lys His Gln Ile Ile Asn Pro
 945 950 955 960
 Val Gln Val Gln Thr Leu Arg Glu Ala Trp Leu Thr Ala Thr Ala Ala
 965 970 975
 Arg Asn Ala Leu Val Leu Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gln Leu Pro
 980 985 990
 Thr Pro Gly Pro His Leu Ala Gln Val Ala Gly Ala Ser Gly Trp Asp
 995 1000 1005

(26)

特開2002-300887

49

50

Pro Asn Glu Tyr Gln Glu Tyr Leu Glu Asn Tyr Leu Lys Val Thr Arg
 1010 1015 1020
 Lys Ser Arg Gln Val Val Asp Glu Val Phe Trp Gly Val Asp Ser Met
 1025 1030 1035 1040
 Glu Gln Arg Glu Phe
 1045

【0124】

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 4
 ggggtcgacg gatcgacagg taatgcatt

29

【0125】

<210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 5
 ggggtcgacg gatccacat gatggagga

29

【0126】

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 6
 cttcccaagta gcaccatacg ac

22

【0127】

40

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 7
 ctggggcag ttcgaagagg tccttg

26

【0128】

<210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 8
 ggacaaggac ctttcgaac tgccag

26

【0129】

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 9
 cggcgagacc gtcgattggg aggagc

26

【0130】

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown

<220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 10
 gtagcacctt acgaccaaac cg

22

【0131】

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 11
 ggagccggtc gacgaggaggc

20

【0132】

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA

	(28)	特開 2002-300887
	53	54
<213> Artificial/Unknown		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> ()..()		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 12		
gctagcctcg ggagctctct aggag		25
【0133】		
<210> 13		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial/Unknown		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> ()..()		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 13		
gatctttccc agactctggc cacgc		25
【0134】		
<210> 14		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Artificial/Unknown		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> ()..()		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 14		
cagttgtggc tgatccg		17
【0135】	30	
<210> 15		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial/Unknown		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> ()..()		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 15		
ctttcccaga ctctggcc		18
【0136】		
<210> 16		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial/Unknown		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> ()..()		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 16		

	(29)	特開2002-300887
	55	56
	cgctgctata attgaacgtg ag	22
【0137】		
	<210> 17	
	<211> 44	
	<212> DNA	
	<213> Artificial/Unknown	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> ()..()	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 17	
	ctttgttgcc atatctgtgc gacgctgcta taattgaacg tgag	44
【0138】		
	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial/Unknown	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> ()..()	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 18	
	ccaccacgaa gtcggtgtggcg g	23
【0139】		
	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial/Unknown	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> ()..()	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 19	
	ttggagcctc gaaggctgga a	21
【0140】		
	<210> 20	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Brevibacterium flavum	
	<400> 20	
	tggtcataatc tgtgcgacgc tgccataat	29
【0141】		
	<210> 21	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> Artificial/Unknown	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> ()..()	

特開2002-300887

	(30)		58
	57		
<223> Description of Artificial Sequence: sequence of promoter			
<400> 21			
tggtcataat tgcgcacgc tgctataat			29
【0142】			
<210> 22			
<211> 29			
<212> DNA			
<213> Artificial/Unknown			
<220>			
<221> misc_feature			
<222> ()..()			
<223> Description of Artificial Sequence: sequence of promoter			
<400> 22			
ttggcatatc tgcgcacgc tgctataat			29
【0143】			
<210> 23			
<211> 23			
<212> DNA			
<213> Artificial/Unknown			
<220>			
<221> misc_feature			
<222> ()..()			
<223> Description of Artificial Sequence: primer			
<400> 23			
agacctacga gtcgccttt ttg			23
【0144】			
<210> 24			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> Artificial/Unknown			
<220>			
<221> misc_feature			
<222> ()..()			
<223> Description of Artificial Sequence: primer			
<400> 24			
cgatcaccag caacccacgc a			21

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 12 R 1:15)		C 12 N 15/00	Z N A A
(C 12 N 1/21			
C 12 R 1:13)			
(C 12 N 9/12			
C 12 R 1:15)			
(C 12 N 9/12			
C 12 R 1:13)			

(C 1 2 P 13/14

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 P 13/14

C 1 2 R 1:13)

(72)発明者 泉井 裕

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素
株式会社発酵技術研究所内

(72)発明者 川嶋 伸樹

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素
株式会社川崎工場内

(72)発明者 中松 亘

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素
株式会社発酵技術研究所内

(72)発明者 倉橋 修

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素
株式会社発酵技術研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA05 BA10 BA74 CA04 DA05

EA04 FA13 GA14

4B050 CC03 DD02 LL02 LL05

4B064 AE19 CA19 CA21 CC24 DA10

4B065 AA24X AA24Y AA27X AA27Y

AB01 BA02 CA17 CA29 CA41